

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2001-200000  
(P2001-200000A)

(43) 公開日 平成13年7月24日(2001.7.24)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/78		C 0 7 K 14/78	4 H 0 4 5
A 2 3 J 1/04		A 2 3 J 1/04	
	5 0 1	3/04	5 0 1
C 0 7 K 1/14		C 0 7 K 1/14	
1/34		1/34	
審査請求 有 請求項の数 8 O L (全 9 頁)			

(21) 出願番号 特願2000-14283(P2000-14283)

(22) 出願日 平成12年1月24日(2000.1.24)

(71) 出願人 000128115

エア・ウォーター株式会社

北海道札幌市中央区北3条西1丁目2番地

(72) 発明者 鹿原 健知

北海道千歳市泉沢1007番地 大同ほくさん

株式会社千歳研究センター内

(72) 発明者 宮崎 聡

北海道千歳市泉沢1007番地 大同ほくさん

株式会社千歳研究センター内

(74) 代理人 100090435

弁理士 齋藤 義雄

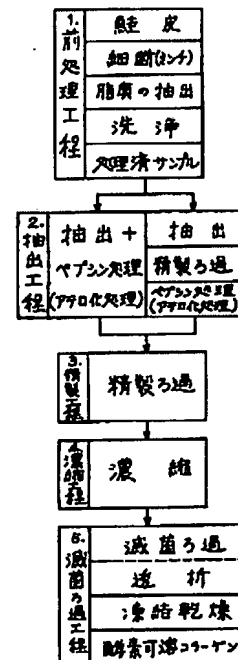
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 海洋生物由来コラーゲンの製造方法

(57) 【要約】

【課題】 現在鮭などからコラーゲンを製造するには、その皮膚が薄いので不純物を含む表皮だけを物理的に除去できず、このため最終的には超遠心分離装置で不純物を除去していることから、量産が不能であり設備も高価となって実用化が困難である。本発明は新規な精製工程と濃縮工程を採択付加することで、色素等の微粒子除去と、コラーゲンの濃縮と付加したペプシン等の除去をも可能とし、安価な設備で外部からの汚染も排除した大量生産を実現可能とする。

【解決手段】 海洋生物の皮膚を脱脂洗浄する前処理工程に続いて、有機酸によりコラーゲンを抽出し、かつペプシン等でアテロ化する抽出工程を行うのは従来法と同じである。次にここで得られた粗コラーゲン溶液から不純物を除去して精製膜を通過させる精製工程により精製コラーゲン溶液を得、さらにこれを濃縮用膜に通過させる濃縮工程を施した後、最終的には従前の滅菌ろ過工程を経て酵素可溶コラーゲンである製品を得る。



1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 海洋生物の皮膚を脱脂した後洗浄して処理済サンプルを得る前処理工程と、この処理済サンプルに有機酸を加えてコラーゲンを抽出すると共に、蛋白質分解酵素を加えてアテロ化を行うことにより粗コラーゲン溶液を抽出する抽出工程と、当該粗コラーゲン溶液から不溶物を除去して精製膜を通過させる精製工程と、これにより得られた精製コラーゲン溶液を濃縮用膜に通過させることにより濃縮して、分子量分画以下の不純物を除去するようにした濃縮工程と、これにより得られた濃縮コラーゲン溶液を、透析処理と滅菌ガスにより加圧することでも過滅菌膜を通過させる滅菌ろ過処理の何れかを先行することにより、滅菌ろ過後サンプルを回収する滅菌ろ過工程とからなることを特徴とする海洋生物由来コラーゲンの製造方法。

【請求項2】 海洋生物の皮膚を脱脂した後洗浄して処理済サンプルを得る前処理工程と、この処理済サンプルに有機酸を加えてコラーゲンを抽出すると共に、蛋白質分解酵素を加えてアテロ化を行うことにより粗コラーゲン溶液を抽出する抽出工程と、当該粗コラーゲン溶液から不溶物を除去して膜サイズが $1.0\mu\text{m}$ 未満 $\sim 0.1\mu\text{m}$ である精密ろ過膜による精製膜を通過させる精製工程と、これにより得られた精製コラーゲン溶液を膜サイズが $1000\text{K}$ 未満 $\sim 10\text{K}$ の限外ろ過膜である濃縮用膜に通過させることにより濃縮して、分子量分画以下の不純物を除去するようにした濃縮工程と、これにより得られた濃縮コラーゲン溶液を、透析処理と滅菌ガスにより加圧することでも過滅菌膜を通過させる滅菌ろ過処理の何れかを先行することにより、滅菌ろ過後サンプルを回収する滅菌ろ過工程とからなることを特徴とする海洋生物由来コラーゲンの製造方法。

【請求項3】 精製工程における精製膜と、濃縮工程における濃縮用膜とが夫々 $0.2\mu\text{m}\sim 0.65\mu\text{m}$ 、 $10\text{K}\sim 100\text{K}$ の膜サイズである請求項1または請求項2に記載の海洋生物由来コラーゲンの製造方法。

【請求項4】 精製工程における精製膜と濃縮工程における濃縮用膜には、夫々粗コラーゲン溶液と精製コラーゲン溶液とが、その流れ方向に対して直交する方向で透過して行くようにした請求項1ないし請求項3に記載の海洋生物由来コラーゲンの製造方法。

【請求項5】 海洋生物の皮膚を脱脂した後洗浄して処理済サンプルを得る前処理工程と、この処理済サンプルに有機酸を加えてコラーゲンを抽出して得た粗コラーゲン溶液から不溶物を除去して精製膜を通過させることで精製ろ過し、次いで蛋白質分解酵素を加えてアテロ化を行うようにした抽出工程と、これにより得られた第1精製コラーゲン溶液を精製膜に通過させる精製工程と、これにより得られた第2精製コラーゲン溶液を濃縮用膜に通過させることにより濃縮して、分子量分画以下の不純物を除去するようにした濃縮工程と、これにより得られ

2

た濃縮コラーゲン溶液を、透析処理と滅菌ガスにより加圧することでも過滅菌膜を通過させる滅菌ろ過処理の何れかを先行することにより滅菌ろ過後サンプルを回収する滅菌ろ過工程とからなることを特徴とする海洋生物由来コラーゲンの製造方法。

【請求項6】 海洋生物の皮膚を脱脂した後洗浄して処理済サンプルを得る前処理工程と、この処理済サンプルに有機酸を加えてコラーゲンを抽出して得た粗コラーゲン溶液から不溶物を除去して膜サイズが $1.0\mu\text{m}$ 未満 $\sim 0.1\mu\text{m}$ である精密ろ過膜による精製膜を通過させることで精製ろ過し、次いで蛋白質分解酵素を加えてアテロ化を行うようにした抽出工程と、これにより得られた第1精製コラーゲン溶液を同上膜サイズの精密ろ過膜による精製膜に通過させる精製工程と、これにより得られた第2精製コラーゲン溶液を膜サイズが $1000\text{K}$ 未満 $\sim 10\text{K}$ の限外ろ過膜である濃縮用膜に通過させることにより濃縮して、分子量分画以下の不純物を除去するようにした濃縮工程と、これにより得られた濃縮コラーゲン溶液を、透析処理と滅菌ガスにより加圧することでも過滅菌膜を通過させる滅菌ろ過処理の何れかを先行することにより、滅菌ろ過後サンプルを回収する滅菌ろ過工程とからなることを特徴とする海洋生物由来コラーゲンの製造方法。

【請求項7】 抽出工程および精製ろ過工程における精製膜と、濃縮工程における濃縮用膜とが夫々 $0.2\mu\text{m}\sim 0.65\mu\text{m}$ 、 $10\text{K}\sim 100\text{K}$ の膜サイズである請求項5または請求項6に記載の海洋生物由来コラーゲンの製造方法。

【請求項8】 抽出工程における精製膜は、その粗コラーゲン溶液がその流れ方向に対して平行する方向で透過して行き、精製工程における精製膜と濃縮工程における濃縮用膜には、夫々粗コラーゲン溶液と第1、第2精製コラーゲン溶液とが、その流れ方向に対して直交する方向で透過して行くようにした請求項5ないし請求項7に記載の海洋生物由来コラーゲンの製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は鮭など海洋生物の皮膚を原料として、各種の医療用生体材料、化粧品材料そして食品材料等に有用である酸可溶性コラーゲンの量産可能な製造方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 既知の通り上記のコラーゲンは主として牛や豚などのほ乳類について、その皮膚を原料として抽出されており、さらに近年上記ほ乳類だけでなく加工処理後に産業廃棄物となる海洋生物の皮膚からもコラーゲンを抽出製造しようとする研究が行われている。先ず前者のほ乳類によるコラーゲン製造の方法にあっては、図6の如くその皮膚層が表皮層aと真皮層bおよび皮下層cとからなり、表皮層aから真皮層bまでが $5\sim 7\text{mm}$ 程

10

20

30

40

50

3

度と可成りの厚さを有すると共に、コラーゲンは真皮層 b に、そして色素等の不純物は表皮層 a に夫々含まれており、同図の d は色素細胞を示している。

【0003】このためほ乳類にあっては前処理工程として、比較的厚手の皮膚から次段の抽出工程に先行して、その色素等を含む表皮層 a を物理的に切離等の手段で除去するようにしているため、後述する海洋生物の場合に比し色素等の混入がほとんどないコラーゲンを得ることが可能である。そして、上記の抽出工程で得られたコラーゲン溶液を遠心分離装置にかけて、さらに不純物を除去した後に滅菌ろ過工程を経てコラーゲンを製造するようにしており、この際上記の遠心分離装置としても大型なものが入手できることから一度に大量のコラーゲンを精製することができ、その量産化が可能となっている。

【0004】しかし、上記ほ乳類の場合に比し、海洋生物からのコラーゲン製造手段については、まだ研究途上にあることから、以下の如き方法が小規模に試行されている段階にある。先ず、鮭等の海洋生物は、その皮膚層が前掲図6と同じく三層により形成されているが、図7の通り皮下層 c を除く表皮層 a から真皮層 b 間までの厚さが約 1 ~ 2mm であって、ほ乳類の場合に比し非常に薄く、しかもコラーゲンはもちろん真皮層 b に含まれており、しかも色素細胞 d は、当該真皮層 b の上層部位に存在し、かつほ乳類に比し当該不純物の量が可成り多い。

【0005】従って海洋生物の場合にあっては、上記の通りその皮膚層が薄いことからほ乳類のように色素等を含んだ部分だけの除去が実際上不能であり、従って第1の前処理工程では図7の鱗 e や身そして、鰭等を除去する程度で鮭皮を得、図8に例示する如くこれを細断した後脂質の抽出、そして洗浄を行うようにし、これにより得られた処理済サンプルを既知の如く有機酸により処理してコラーゲンを抽出すると同時にペプシン等を加えてアテロ化するか、同上図の如く抽出処理後に遠心分離装置にかけ、その後でアテロ化処理を行う何れかの方法を選択して第2の抽出工程を実施するようにしている。この結果コラーゲンの抽出後の溶液中には色素等の不純物が、当然のことながら微粒子となって多数存在することとなり、しかもこの微粒子は重量が非常に軽いため、前記した抽出工程における通常の遠心分離処理では沈殿することなく、その除去が充分にできない。

【0006】そこで上記抽出工程で得られた粗コラーゲンを、次の第3である精製工程において、先ず塩析と遠心分離を繰り返すことにより、塩析で得た沈殿を遠心分離で回収して、ペプシンの除去と不純物の除去とを行い、これに酢酸を加えて酸可溶性コラーゲンを得、さらにこれを超遠心分離装置にかけて、その上清を回収するようにしている。そして、上記図8に示す如く最終である第4の滅菌ろ過工程へ移行するが、ここで前工程での回収上清による濃縮液をろ過滅菌膜に通して滅菌ろ過し、透過液を脱イオン水により透析するか、この透析を

4

先行させて滅菌ろ過を後に行うようにし、その後に凍結乾燥することで酵素可溶性コラーゲンを得るようにしている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】上記した海洋生物由来コラーゲンの製造方法によるときは、第3の精製工程で塩析や遠心分離を行うのであるが、当該遠心分離を何回も繰り返し行うことだけでは、多数存在していた不純物としての軽い微粒子は可成りの時間をかけても除去できず、その後に超遠心分離相当 (100, 000 × G) の遠心力を与えて当該微粒子を沈殿させて除去しなければならない。ところが、超遠心分離装置としては、一度に大量の精製可能なものを得ることができず、一回で精製できるコラーゲンの量は 400cc 程度であり、しかも量産規模分の台数を揃えることは、非常に高価であるため設備投資の面からも非合理的と考えられている。そこで、この解決策として魚皮から色素等の不純物を除去することの困難性に鑑み、当該コラーゲンの製造に際しては無色色素の魚皮、特にフラットフィッシュの皮からコラーゲンの抽出を行うようにした内容の製造方法 (特許第 2722014 号) も提案されている。

【0008】本願発明にあっては、上記従来技術の難点に鑑み検討されたもので、請求項1によるときは図8によりコラーゲンの製造方法に比し、第1、第2の夫々前処理工程と抽出工程そして最終の滅菌ろ過工程には本質的な相違はないが、前記第3の精製工程のように遠心分離や塩析そして超遠心分離処理を行うのではなく、精製ろ過処理による精製工程と次段の濃縮処理による濃縮工程を設定するようにして、当該前者の精製ろ過処理によって従来の超遠心分離装置を用いることなしに色素等の微粒子除去を可能となし、上記後者の濃縮工程ではコラーゲンを濃縮すると共に従来遠心分離で除去していたペプシンなどの不純物除去をも可能にしようとしている。このことにより請求項1では上記の精製工程における精製ろ過処理により抽出工程後の粗コラーゲン溶液から色素等の不純物の除去を高価な設備なしに連続的に実現可能とし、必要生産規模に応じたコラーゲンの大量精製を実現しようとするのが第1の目的である。しかも上記従来の製造方法に比し製造日程の大幅な短縮を可能とし、遠心分離と違って閉鎖的な製造ラインが採択できるようにし、このことにより外部からの汚染についても心配のない衛生面からも安心して製造できるようにするのが第2の目的であり、かくして産業廃棄物とされている海洋生物の皮膚から、安価な提供が望まれているコラーゲンを医療関係、化粧関係、食品関係に提供可能にしようとしている。

【0009】次に請求項2にあっては、上記した請求項1における精製工程で抽出工程からの粗コラーゲン溶液から不要物を除去するための精製膜に関し、その膜サイズを 1.0 μm 未満 ~ 0.1 μm とすることで、さらに

5

コラーゲンの回収率を低下させず、しかも色素の微粒子除去効率をも低下させることのない、より望ましい精製効果を発揮させ得るようにするのが第1の目的である。そして、さらに請求項2では、これまた請求項1における前掲濃縮工程で、上記精製ろ過工程から精製コラーゲン溶液の分子量分画以下の不純物を除去する濃縮用膜に関し、その膜サイズを1000K未満～10Kの限界ろ過膜とすることで、ペプシン等の不純物除去率の低下とコラーゲンの回収率低下との回避を両立させて、より望ましい濃縮効果をあげようとするのが第2の目的である。

【0010】請求項3の場合には、上記請求項1と請求項2にあって、より望ましい精製効果と濃縮効果につき、その信頼性を高めるためには精製膜の膜サイズは0.2 $\mu$ m～0.6 $\mu$ m、濃縮用膜の膜サイズは10K～100Kと特定するのが、より望ましいことを明示している。

【0011】そして請求項4にあっては、上記の請求項1ないし請求項3にあって、同上精製膜と濃縮用膜とに対し、夫々粗コラーゲン溶液や精製コラーゲン溶液そして濃縮コラーゲン溶液が、その流れ方向と直交するように透過させるようにし、不純物が膜表面に堆積することを排除して目詰まりの生じないようにし、最終的に得られる酵素可溶コラーゲンの純度を、より向上させようとしている。

【0012】次に請求項5以降にあっては、上記のものが抽出工程にあって抽出とアテロ化を同時に進行させて抽出されるコラーゲンの量を増加させようとするのに対して、抽出によって得た粗コラーゲン溶液から不純物を除去して精製膜を通過させることで精製ろ過を行い、これにより不純物を除去し後にアテロ化を行うようにした点で相違しており、かくして前記図8の従来例の如く遠心分離によることなしに、精製ろ過処理をここで採択してその後の精製工程における不純物の除去を、より行い易くしようとしている。

【0013】そして請求項6では前記の請求項1に対する請求項2のように、請求項5に対して抽出工程と精製工程では膜サイズ1.0 $\mu$ m未満～0.1 $\mu$ mの精製膜、そして濃縮工程では膜サイズが1000K未満10Kの濃縮用膜を採択して、夫々精製効果と濃縮効果とを助長しようとしており、請求項7では前記の請求項3と同様に夫々の膜サイズにつき0.2 $\mu$ m～0.6 $\mu$ m、そして10K～100Kの如くその選択範囲を限定することにより、上記精製効果と濃縮効果の、より望ましい結果を得ようとしている。また請求項8によるときは、請求項5ないし請求項7に対して、抽出工程や精製工程の精製膜、さらには濃縮工程における濃縮用膜には、粗コラーゲン溶液と第1、第2精製コラーゲン溶液と濃縮コラーゲン溶液とが、その流れ方向に対して直交するよう透過させることで、その不純物除去効率を向上しよう

6

としている。

【0014】

【課題を解決するための手段】本発明は上記の目的を達成するため、請求項1にあっては、海洋生物の皮膚を脱脂した後洗浄して処理済サンプルを得る前処理工程と、この処理済サンプルに有機酸を加えてコラーゲンを抽出すると共に、蛋白質分解酵素を加えてアテロ化を行うことにより粗コラーゲン溶液を抽出する抽出工程と、当該粗コラーゲン溶液から不溶物を除去して精製膜を通過させる精製工程と、これにより得られた精製コラーゲン溶液を濃縮用膜に通過させることにより濃縮して、分子量分画以下の不純物を除去するようにした濃縮工程と、これにより得られた濃縮コラーゲン溶液を、透析処理と滅菌ガスにより加圧することでもろ過滅菌膜を通過させる滅菌ろ過処理の何れかを先行することにより、滅菌ろ過後サンプルを回収する滅菌ろ過工程とからなることを特徴とする海洋生物由来コラーゲンの製造方法を提供しようとするものである。

【0015】さらに請求項2では、上記請求項1の内容に付加して、その前処理工程において得られた処理済サンプルに有機酸を加えてコラーゲンを抽出すると共に、蛋白質分解酵素を加えてアテロ化を行うことにより粗コラーゲン溶液を抽出する抽出工程と、当該粗コラーゲン溶液から不溶物を除去して膜サイズが1.0 $\mu$ m未満～0.1 $\mu$ mである精密ろ過膜による精製膜を通過させる精製工程と、これにより得られた精製コラーゲン溶液を膜サイズが1000K未満～10Kの限界ろ過膜である濃縮用膜に通過させることにより濃縮して、分子量分画以下の不純物を除去するようにした濃縮工程と、これにより得られた濃縮コラーゲン溶液を、透析処理と滅菌ガスにより加圧することでもろ過滅菌膜を通過させる滅菌ろ過処理の何れかを先行することにより、滅菌ろ過後サンプルを回収する滅菌ろ過工程とからなることを、その内容としている。

【0016】次いで請求項3では、上記請求項1または請求項2にあって、精製工程における精製膜と、濃縮工程における濃縮用膜とが夫々0.2 $\mu$ m～0.65 $\mu$ m、10K～100Kの膜サイズであることを、その内容としている。

【0017】そして請求項4にあっては、請求項1ないし請求項3において、精製工程における精製膜と濃縮工程における濃縮用膜には、夫々粗コラーゲン溶液と精製コラーゲン溶液と濃縮コラーゲン溶液とが、その流れ方向に対して直交する方向で透過して行くようにしたことを、その内容としている。

【0018】次いで請求項5によるときは、その抽出工程だけが、前記の請求項1ないし請求項4と相違し、前処理工程で得た処理済サンプルに有機酸を加えてコラーゲンを抽出して得た粗コラーゲン溶液から不溶物を除去して精製膜を通過させることで精製ろ過し、次いで蛋白

10

20

30

40

50

7

質分解酵素を加えてアテロ化を行うようにしている。

【0019】また請求項6では、請求項5の構成要件に対し、抽出工程にあって膜サイズが1.0 $\mu$ m未満～0.1 $\mu$ mである精密ろ過膜による精製膜を通過させて精製ろ過すると共に、膜サイズが1000K未満～10Kの限外ろ過膜である濃縮用膜を通過させることにより濃縮させるようにした内容を付加している。

【0020】そして請求項7では、上記請求項6における両膜サイズの範囲を、さらに減縮して精製膜とろ過滅菌膜につき夫々0.2 $\mu$ m～0.65 $\mu$ m、10K～1000Kとしている。

【0021】請求項8にあっては、前記の請求項5～請求項7において、抽出工程における精製膜は、その粗コラーゲン溶液がその流れ方向に対して平行する方向で透過して行き、精製工程における精製膜と濃縮工程における濃縮用膜には、夫々粗コラーゲン溶液と第1、第2精製コラーゲン溶液と濃縮コラーゲン溶液とが、その流れ方向に対して直交する方向で透過して行くようにしたことを、その内容としている。

【0022】

【発明の実施の形態】本発明の請求項1ないし請求項4に係るコラーゲンの製造方法について図1、図2そして図4と図5を参照して以下説明すると、請求項1では第1の前処理工程と第2の抽出工程と第3の精製工程そして第4の濃縮工程および第5の滅菌ろ過工程とからなっている。第1の前処理工程では、従前の実施内容と同じく鮭皮等の魚皮を流水中で前説の如く身などの不要部を除去して3cm角程度に細断し、例えばクロロホルムとメタノールの混合溶液にミンチ済魚皮を投入して攪拌し、当該溶媒を交換して再攪拌を繰り返した後、メタノールに置換そして脱イオン水に置換して洗浄後、さらに20%NaClを含んだ緩衝溶液等による洗浄そして脱イオン水による洗浄を、洗浄液の交換により繰り返して中性蛋白質を除去することで図1に示す処理済サンプルを得る。

【0023】第2の抽出工程に関しても、その内容はサンプルを投入した図2の製造装置における抽出タンク1a、1bに、0.5M酢酸と対基質重量の1%のペプシン、あるいはその他の蛋白質分解酵素を加えて攪拌することで既知の如くアテロ化を行う。このように上記有機酸によるコラーゲンの抽出と同時にアテロ化を行うようにして粗コラーゲン溶液を得るようにすれば、抽出されるコラーゲンの量が増加する利点があるけれど、同時に色素等の不純物も大量に溶液中へ混入してくることになることも知られている。

【0024】このようにして得られた粗コラーゲンS1は、ナイロンメッシュなどを用いて不溶物を除去した後、図2のポンプ2a、2bを稼働させることによりサンプルタンク3に移し、ここで新規な第3の精製工程を実施することになる。すなわち、サンプルタンク3の粗

8

コラーゲンS1はポンプ3a、3bを用いて流速を制御させながら精製膜4を通過させた後、ここで得られた精製コラーゲン溶液S2は精製・濃縮タンク5に移送される。そして図示例では、精製膜4によって通過を阻止された残留物等が、サンプル循環管路6を介して前記のサンプルタンク3に戻り、またコラーゲンの回収量の増量化を図るため、溶媒添加用タンク7から溶媒添加管路8を介してポンプ9により、前記した酢酸等による溶媒を、サンプルタンク3へ流送添加することで、当該残留物等に含まれるコラーゲン分子を、さらに回収しようとしている。

【0025】次に実施される第4の濃縮工程にあっては、上記した図2の精製・濃縮タンク5に入った精製コラーゲン溶液S2を、ポンプ10により流速等を制御しながら濃縮用膜11を通過させた後、同上精製・濃縮タンク5へサンプル循環管路12を介して戻すことにより濃縮されることになり、この際生じた不溶物は溶媒と共に排水管路13から廃液タンク14へ排出され、かくして当該濃縮工程により、液量の増えた精製コラーゲン溶液S2の濃縮と、分子量分画以下の不純物の除去がなされることで濃縮コラーゲン溶液S3を得る。

【0026】さらに実施される第5の滅菌ろ過工程は、図1に示されている通り前記従来のそれと実質的に同じ内容であり、前記した精製・濃縮タンク5に得られた濃縮コラーゲン溶液S3を、ポンプ15によって濃縮サンプル管路16から、ろ過滅菌用タンク17へと送流して、全量の送液が終わったならば加圧用気体管路18からの滅菌空気とか滅菌窒素ガスによる加圧ガス19によって、ろ過滅菌膜20としての膜サイズが例えば0.22 $\mu$ mといったものを用いてこれを通過させ、このことで製品としてのろ過滅菌後サンプルS4を回収したり、これを凍結乾燥機21に送って製品とし、かくして酵素可溶コラーゲンを得るのである。もちろん、この間既知の如く全工程にわたって温度制御を行い10℃以下好ましくは4℃～5℃程度に保持するのがよく、これは蛋白質の変性を防止するためである。

【0027】なおここで因みに前記精製工程にあっては、予め精製膜4の洗浄、フラッシング、初期清水透過流速の確認を行い、上記フラッシング後、必要があればバッファー等で系内を最適化するのがよい。また適宜原液に対して溶媒等を加水することが望ましく、経時的に圧力や温度を設定し、十分量の透過液が得られたらポンプ3bを停止し、透過側系内の清澄液を極力回収する。また、これまた因みに濃縮手順としても、前記の濃縮用膜11について前同洗浄、フラッシング、初期清水透過流速の確認そして必要なバッファー等で系内を最適化するのがよく、濃縮は必要に応じた濃縮倍率で行うのがよい。

【0028】次に請求項2について以下詳記すると、ここでは請求項1に説示の抽出工程後に実施される精製工

20

30

40

50

9

程にあって用いられる精密ろ過 (MF) 膜としての精製膜 4 と、これに続いて実施の濃縮工程で用いられる濃縮用膜 11 について、その各膜サイズを特定範囲内に選定するようにしている。先ず精製膜 4 の膜サイズについては、 $1.0 \mu\text{m}$ 未満～ $0.1 \mu\text{m}$ とするのが好ましい。すなわち  $1.0 \mu\text{m}$ 以上の膜サイズにすると色素の微粒子除去が困難になってくることになり、一方膜サイズが  $0.1 \mu\text{m}$ よりも小さくなると、コラーゲンの回収率が低下して来ることを確認することができた。そして濃縮用膜 11 については、分子量分画が  $1000\text{K}$ 未満～ $10\text{K}$ の限外ろ過 (UF) 膜を使用するのが好ましい。すなわち  $1000\text{K}$ 以上の場合にはコラーゲンの回収が低下してしまうことになり、一方  $10\text{K}$ よりも小さくなるとペプシン等の不純物除去率が低下してしまうのである。

【0029】さらに請求項 3 によるときは、上記の請求項 1 または請求項 2 において、その精製膜 4 と濃縮用膜 11 の膜サイズにつき、さらに望ましい寸法範囲を選定するようにしており、精製膜については  $0.2 \mu\text{m}$ ～ $0.65 \mu\text{m}$ にすれば、 $0.65 \mu\text{m}$ 以下とすることによって色素の微粒子除去率を低下させず、しかも  $0.2 \mu\text{m}$ 以上とすることによってコラーゲンの回収率をも低下させないことを保証することができた。また濃縮用膜 11 にあっては、 $10\text{K}$ ～ $100\text{K}$ の膜サイズとすることで、ペプシン等の不純物除去率を低下させず、かつコラーゲンの回収率をも低下させないことを保証することができた。

【0030】さて請求項 4 にあっては、上記の請求項 1 ないし請求項 3 において用いた精製ろ過工程の精製膜 4 と濃縮工程の濃縮用膜 11 につき、その何れについてもタンジェンシャル・フロー・フィルトレーション (TFF) を用いるようにするのである。通常多用の膜種では、図 4 の如く膜 F 1 と、これに対する透過溶液の流れ方向 D 1 とが直交状態となるようにし、従って当該流れ方向 D 1 と平行する方向で透過して透過側 P 1 に流出することになるが、上記の TFF では図 5 のように粗コラーゲン溶液 S 1 や精製コラーゲン溶液 S 2 の透過溶液が、その流れ方向 D 2 に対して直交する方向へ、精製膜 4 や濃縮用膜 11 である一対の膜 F 2 を夫々透過し、夫々の透過側 P 2、P 3 へ流出することになる。従って TFF を用いることで、膜 F 2 の膜面に対する不純物等の堆積が透過溶液の流動によって防止され、目詰りのない透過状態を保持することができる。この結果請求項 4 によるときは、その精製ろ過処理と濃縮処理とを極めて短期日内に処理することができると共に、コラーゲンの回収率と色素の微粒子やペプシン等の不純物除去率を向上させることが可能となる。

【0031】次に請求項 5 以降につき詳記すると、先ず請求項 5 では前説の請求項 1 に対して以下の相違点を有している。すなわち、図 1 に示されている通りその抽出

10

工程に関し、抽出処理とアテロ化処理が前記の如く同時に行われるのではなく、各別実施されるのであり、この場合は図 3 に示す如き製造装置によって実施することができる。ここで図 3 の製造装置が図 2 のそれと相違するところは、前記したサンプルタンク 3 と精製・濃縮タンク 5 とが、ポンプ 22 を介接した第 1 精製サンプル流路 23 によって連通されていることであり、もちろん図 2 と同一の部材については同一符号が付されている。

【0032】さて、同上製造装置を用いて請求項 5 を実施するに際し、請求項 1 と相違するその抽出工程を実施するには、前同様にして前処理工程により得られた処理済サンプル S 1 を抽出タンク 1a にあって有機酸を加えてコラーゲンを押出して得た粗コラーゲン溶液 S 1 を、ポンプ 2a でサンプルタンク 3 に投入する。そしてこれまた図 2 と同様にしてポンプ 3a とポンプ 3b により流速等をコントロールしながら、精製膜 4 を通過させて第 1 精製コラーゲン S 5 を、精製・濃縮コラーゲン 5 に流入させる。これまた前同様にして残留物はサンプル循環流路 6 を介してサンプルタンク 3 に帰還する。また回収量を増やすため一定量の溶媒を、溶媒添加用タンク 7 から溶媒添加流路 8 よりサンプルタンク 3 へ加える。次いで当該請求項 5 にあっては、前記精製・濃縮タンク 5 の第 1 精製コラーゲン溶液 S 5 を、前説の第 1 精製サンプル流路 23 を介して、ポンプ 22 によりサンプルタンク 3 へ戻し、ここでペプシン等を加えることでアテロ化処理を行うのである。かくしてアテロ化されたものを、次段の精製工程により精製ろ過処理を行うが、当該実施態様では再び前記の通り精製膜 4 を介して繰り返しの精製を行い、これにより得られた第 2 精製コラーゲン溶液 S 6 が、前記の精製・濃縮タンク 5 に流入されることになる。そして以後は濃縮工程と減菌ろ過工程を経て前記の請求項 1 と同様にして第 2 ろ過減菌後サンプル S 7 を回収するのである。

【0033】次に請求項 6 では、前記請求項 1 に対する請求項 2 のように、請求項 5 における抽出工程における精製膜の膜サイズを  $1.0 \mu\text{m}$ 未満～ $0.1 \mu\text{m}$ に、そして精製工程の精製膜と濃縮工程における濃縮用膜の膜サイズを  $1000\text{K}$ 未満～ $10\text{K}$ に特定することで、コラーゲンの回収量を確保することと、色素等不純物の除去とを両立させようとしている。

【0034】さらに、請求項 7 では請求項 1 に対する請求項 3 のように、上記した膜サイズの特定値を限縮して、夫々  $0.2 \mu\text{m}$ ～ $0.65 \mu\text{m}$ 、 $10\text{K}$ ～ $100\text{K}$ とすることで、より望ましい結果を得るようにしている。

【0035】そして請求項 8 にあっては、請求項 1 に対する請求項 4 と同様にして抽出工程の精製膜では通常のろ過膜を用いるが、精製工程の精製膜と濃縮工程の濃縮用膜については、前説したタンジェンシャル・フロー・フィルトレーション (TFF) を用いることで、不純物

11

の除去作用につきその信頼性を持続させようとしている。

【0036】

【発明の効果】本発明は以上のようにして実施し得るものであるから、請求項1によるときは、従来の製法では抽出工程後における精製工程にあって色素細胞等の不純物を除去するのに、遠心分離や塩析では、その目的を達成し得ず、さらに超遠心分離に頼るようにしていたため、量産不能にして極めて高価につくことに鑑み、かかる精製工程を廃し、精製ろ過処理による精製工程に次いで、濃縮工程を実施するようにしたので、色素等の不純物除去を高価な設備なしで生産規模に応じたコラーゲンの大量精製を実現でき、コラーゲンに対する社会的な要請を充足することが可能となる。さらに請求項1によるときは、前記従来の製造方法に比しその製造日数を大幅に短縮することが確認された。すなわち、具体的な比較例を示すと、従来前の精製工程における遠心分離と塩析は2〜3回繰り返し実施され、これには10〜20日を要していたものが、本発明に係る新規な精製ろ過工程とこれに引き続き実施される濃縮工程を1〜2日で完了することが可能となり、しかも当該両工程は前記従来の遠心分離とか超遠心分離と違って、閉鎖的な製造ラインを採択できることとなるので、外部汚染の心配がなく、衛生的な面からも安心して製造することが可能となる。

【0037】請求項2にあっては、上記の両工程における夫々の精製膜と濃縮用膜の各両膜サイズを夫々特定することで、夫々コラーゲンの回収率と色素の除去効率の両立と、コラーゲンの回収率とペプシン等の不純物除去率との望ましい両立を可能とすることができる。さらに請求項3にあっては、上記請求項2における膜サイズの範囲を限定することで、請求項2による効果をさらに助長することが可能となり、請求項4では精製膜と濃縮用膜について、通常のろ過膜を使用するのではなく、前記TFFを採択することでコラーゲンに係る最終製品の純度を、より向上させることが可能となる。

【0038】次に請求項5にあっては、従来の製法でも実施されている抽出工程で、抽出とアテロ化との各処理間に遠心分離処理を施すようにしていたのに対し、当該

12

遠心分離処理を廃して、精製ろ過処理を行うことにより第1精製コラーゲン溶液を得るようにしたので、その続行工程である精製工程と濃縮工程以前における当該精製ろ過処理にあって、コラーゲンに対する不純物の除去が行われることから、精製をより行い易く純度の高いコラーゲンの製造に益すること大である。そして請求項6、7、8については、上記した請求項1に対する夫々請求項2、3、4と同様の付加的効果を発揮し得ることとなるので、その詳細については前説の該当内容を援用する。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係る請求項1と請求項5に係る海洋生物由来コラーゲンの製造方法を示す工程説明図である。

【図2】請求項1に係る製造方法を実施することのできる製造装置の一例を示した装置系統図である。

【図3】請求項5に係る製造方法を実施するのに用い得る製造装置の一例を示した装置系統図である。

【図4】不純物除去に用いられる汎用精製膜を示す作用説明図である。

【図5】不純物除去に用いられるタンジェンシャル・フロー・フィルトレーション(TFF)を示した作用説明図である。

【図6】ほ乳類の皮膚層を示す縦断説明図である。

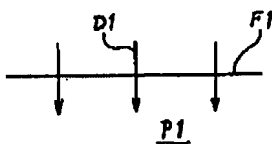
【図7】海洋生物の皮膚層を示す縦断説明図である。

【図8】従来の海洋生物由来コラーゲン製造の方法を示した工程説明図である。

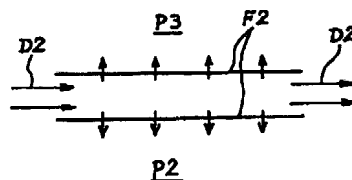
【符号の説明】

- 4 精製膜
- 11 濃縮用膜
- 20 ろ過滅菌膜
- S1 粗コラーゲン溶液
- S2 精製コラーゲン溶液
- S3 濃縮コラーゲン溶液
- S4 滅菌ろ過後サンプル
- S5 第1精製コラーゲン溶液
- S6 第2精製コラーゲン溶液
- S7 滅菌ろ過後サンプル

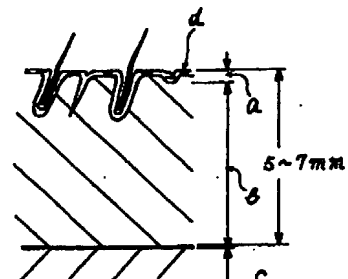
【図4】



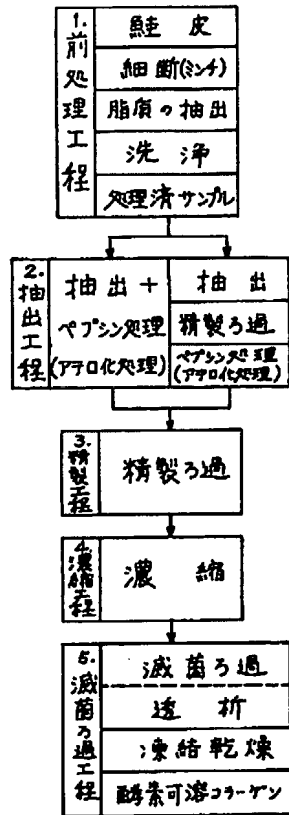
【図5】



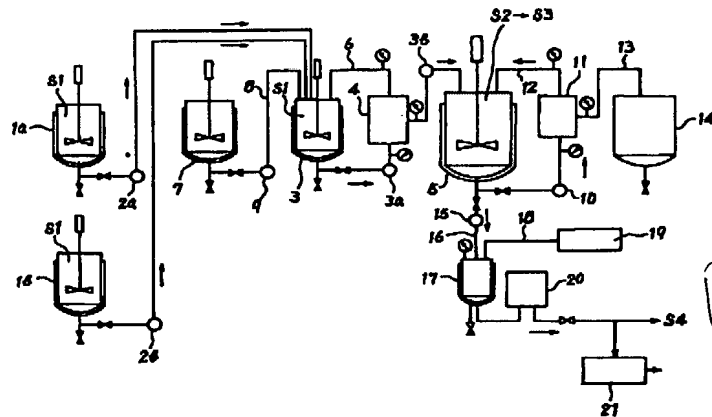
【図6】



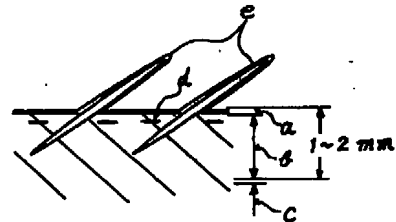
【図1】



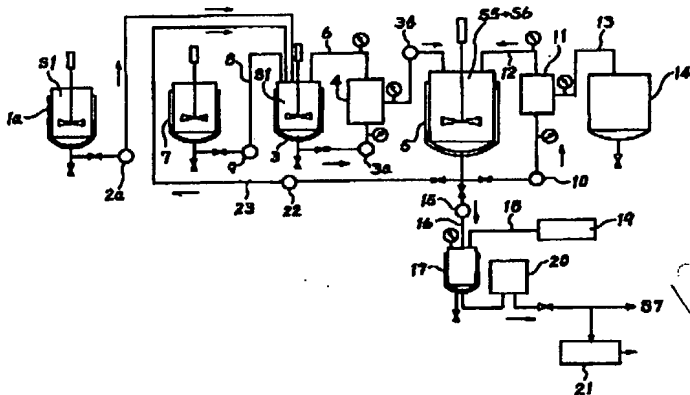
【図2】



【図7】

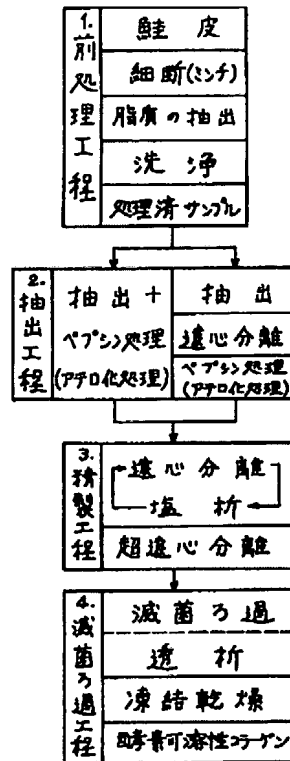


【図3】





【図8】



フロントページの続き

(72) 発明者 岡村 美奈  
 北海道千歳市泉沢1007番地 大同ほくさん  
 株式会社千歳研究センター内

Fターム(参考) 4H045 AA20 CA52 EA01 EA15 EA34  
 FA16 FA70 GA01 GA10

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-200000

(43)Date of publication of application : 24.07.2001

(51)Int.Cl.

C07K 14/78  
A23J 1/04  
A23J 3/04  
C07K 1/14  
C07K 1/34

(21)Application number : 2000-014283

(71)Applicant : AIR WATER INC

(22)Date of filing : 24.01.2000

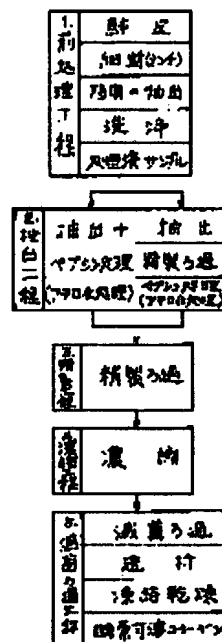
(72)Inventor : SHIKAHARA TAKETOMO  
MIYAZAKI SATOSHI  
OKAMURA MINA

## (54) METHOD FOR PRODUCING COLLAGEN DERIVED FROM MARINE ORGANISM

## (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To enable the removal of finely divided particles such as coloring matter, the concentration of collagen and the removal of added pepsin or the like and to realize mass production in an inexpensive equipment with pollution of outside excluded by employing and adding new purification and concentration processes because it is difficult to put the present method for producing collagen from salmon, etc., into practical use due to the thinness of salmon skin leading to the impossibility of physically removing impurity-containing epidermis alone and therefore to both of the impossibility of mass production and the expensiveness of equipment because of finally performing the removal of impurities by an ultracentrifuge.

**SOLUTION:** It is the same way as a conventional one that a preprocessing process for degreasing and cleansing skins of marine organisms is followed by an extracting process for extracting collagen with an organic acid and also making it atheromatous using pepsin, etc. Then, a purified collagen solution is obtained by a purifying process for removing impurities from the crude collagen solution obtained there and for making the solution pass through a purification membrane. The collagen solution is applied with a concentrating process for making it pass through a concentration membrane and is finally applied with a conventional filtration process for sterilization to obtain a product of soluble collagen in enzyme.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 10.08.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3532817

[Date of registration] 12.03.2004

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

\* NOTICES \*

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] While adding an organic acid to the head end process which washes after degreasing the skin of a marine organism, and obtains a processed sample, and this processed sample and extracting a collagen The extract process which extracts a rough collagen solution by adding a proteolytic enzyme and performing ATERO-ization, The purification process which insoluble matter is removed [ process ] from the rough collagen solution concerned, and passes the purification film, It condenses by making the film for concentration pass the purification collagen solution obtained by this. By preceding any of sterilization filtration processing which pass the filtration sterilization film by the concentration process which removed the impurity below molecular weight fractionation, and pressurizing the concentration collagen solution obtained by this by dialysis processing and sterilization gas they are The manufacture approach of the marine organism origin collagen characterized by consisting of a sterilization filtration process of collecting the samples after sterilization filtration.

[Claim 2] While adding an organic acid to the head end process which washes after degreasing the skin of a marine organism, and obtains a processed sample, and this processed sample and extracting a collagen The extract process which extracts a rough collagen solution by adding a proteolytic enzyme and performing ATERO-ization, The purification process which insoluble matter is removed [ process ] from the rough collagen solution concerned, and passes the purification film by the membrane filter whose film size is less than 1.0 micrometers - 0.1 micrometers, It condenses by making the film for concentration whose film size is the ultrafiltration membrane of less than 1000K-10K pass the purification collagen solution obtained by this. By preceding any of sterilization filtration processing which pass the filtration sterilization film by the concentration process which removed the impurity below molecular weight fractionation, and pressurizing the concentration collagen solution obtained by this by dialysis processing and sterilization gas they are The manufacture approach of the marine organism origin collagen characterized by consisting of a sterilization filtration process of collecting the samples after sterilization filtration.

[Claim 3] The manufacture approach of a marine organism origin collagen according to claim 1 or 2 that the purification film in a purification process and the film for concentration in a concentration process are the film sizes it is [ sizes ] 0.2 micrometers - 0.65 micrometers, and 10K-100K, respectively.

[Claim 4] The manufacture approach of claim 1 with which a rough collagen solution and a purification collagen solution penetrate towards intersecting perpendicularly to the flow direction, and it was made to go to the purification film in a purification process, and the film for concentration in a concentration process, respectively thru/or a marine organism origin collagen according to claim 3.

[Claim 5] The head end process which washes after degreasing the skin of a marine organism, and obtains a processed sample,

## \* NOTICES \*

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

## DETAILED DESCRIPTION

## [Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to various kinds of medical-application biomaterials, cosmetics ingredients, food ingredients, etc. by using the skin of marine organisms, such as a salmon, as a raw material at the manufacture approach which can mass-produce a useful acid fusibility collagen.

[0002]

[Description of the Prior Art] The skin is mainly extracted from the known collagen of the passage above as a raw material about the mammals, such as a cow and a pig, and research which is going to carry out extract manufacture of the collagen not only from the above-mentioned mammals but from the skin of the marine organism which turns into industrial waste after processing processing is done further in recent years. If it is in the approach of the collagen manufacture by the former mammals first, while the stratum cutaneum membranae tympani consists of the epidermis layer a, a dermic layer b, and a subcutaneous layer c and from the epidermis layer a to the dermic layer b has the thickness of about 5-7mm and \*\*\*\*\* like drawing 6, impurities, such as a dermic layer b and coloring matter, are contained in the epidermis layer a for the collagen, respectively, and, as for d of this drawing, the chromocyte is shown.

[0003] For this reason, if the mammals have, it is possible as a head end process to obtain the collagen which precedes with the extract process of the next step from the thick skin comparatively, compares in the case of the marine organism later mentioned since he is trying for means, such as separation, to remove physically the epidermis layer a containing that coloring matter etc., and does not almost have mixing of coloring matter etc. And the collagen solution obtained at the above-mentioned extract process is covered over a centrifugal separator, after removing an impurity further, a lot of collagens can be refined at once from he trying to manufacture a collagen through a sterilization filtration process, and a thing large-sized also as a centrifugal separator of the above in this case being able to come to hand, and that fertilization is possible.

[0004] However, in the case of the above-mentioned mammals, it compares, and about the collagen manufacture means from a marine organism, since it is still in the research way, it is in the phase where the approach like a less or equal is tried on a small scale. First, although the stratum cutaneum membranae tympani is formed of three layers as well as above-shown drawing 6, marine organisms, such as a salmon The thickness from the epidermis layer a except a subcutaneous layer c to between dermic layers b is about 1-2mm as drawing 7. in the case of the mammals, it compares, and is very thin, and, moreover, a collagen is natural — it contains in a dermic layer b — having — \*\*\*\* — moreover — Chromocyte d — about the management of the dermic layer b concerned — existing — and the mammals — comparing — the amount of the impurity concerned — \*\*\*\*\* — many.

[0005] therefore, removal of only the part which contained coloring matter etc. like [ if it is in the case of a marine organism / since the stratum cutaneum membranae tympani is thin as above-mentioned ] the mammals — in practice — impossible — therefore — the 1st head end process — the scale e of drawing 7, and the body — and After carrying out beating of this so that salmon skin may be obtained with extent which removes a pterygium etc. and it may illustrate to drawing 8, a lipid extraction, And [ whether a pepsin etc. is added and ATERO-ized at the same time it is made to wash, it processes like known the processed sample obtained by this by the organic acid and it extracts a collagen, and ] As shown in a Fig. same as the above, it applies to a centrifugal separator after extract processing, which method of performing ATERO-ized processing after that is chosen, and it is made to carry out the 2nd extract process. As a result, into the solution after the extract of a collagen, impurities, such as coloring matter, serve as a particle with a natural thing, a large number existence will be recognized, and moreover, since this particle has very light weight, it cannot fully perform that removal in the usual centrifugal separation processing in the above mentioned extract process, without precipitating.

[0006] Then, the precipitate obtained by the salting-out is collected by centrifugal separation, and he is trying to collect the supernatant liquid by repeating a salting-out and centrifugal separation first in the purification process which is the following 3rd about the rough collagen obtained at the above-mentioned extract process, performing removal of a pepsin, and removal of an impurity, adding an acetic acid to this, obtaining an acid fusibility collagen, and applying this to ultra-centrifugal separation equipment further. And although it shifts to the 4th sterilization filtration process which is last as shown in above-mentioned drawing 8, sterilization filtration is carried out through the concentration liquid by the recovery supernatant liquid in a last process here at the filtration sterilization film, and dialyze permeate liquid by deionized water, or this dialysis is made to precede, it is made to carry out sterilization filtration behind, and the enzyme fusibility collagen is made to obtain with freeze-drying after that.

[0007]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] only by repeating the centrifugal separation concerned repeatedly and performing it, although a salting-out and centrifugal separation are performed at the 3rd purification process when based on the manufacture approach of the above-mentioned marine-organism origin collagen, even if the light particle as an impurity which existed spends the time amount of \*\*\*\*\*, it cannot be removed, it must give the centrifugal force of ultra-centrifugal separation (100,000xG) after that, must settle the particle concerned, and must remove — \*\*. However, as ultra-centrifugal separation equipment, the amount of the collagen which cannot obtain the thing in which a lot of purification is possible, but can be refined at once is about 400 cc, and at once, since it is very expensive to arrange the number for a mass-production scale moreover, irrational-like is thought also from the field of plant-and-equipment investment. Then, in view of the difficulty of removing impurities, such as coloring matter, from a fishskin, the manufacture approach (patent No. 2722014) of the contents of having been made to extract the collagen from the fishskin of colorless coloring matter, especially the hide of a flat fish on the occasion of manufacture of the collagen concerned is also proposed as this solution.

[0008] If it is in the invention in this application, it is what was examined in view of the difficulty of the above-mentioned conventional technique. Although it compares with the manufacture approach of a collagen by drawing 8 and there is no 1st and 2nd difference respectively essential to a head end process, an extract process, and the last sterilization filtration process when based on claim 1 Centrifugal separation, a salting-out, and ultra-centrifugal separation processing are not performed like said 3rd purification process. The purification process by purification filtration processing and the concentration process by concentration processing of the next step are set up. It is also going to enable impurity removal of the pepsin which had removed particle removal of coloring matter etc. by centrifugal separation conventionally while condensing the collagen at the concentration process of nothing and the above-mentioned latter as it is possible, without using conventional ultra-centrifugal separation equipment by purification filtration processing of the former concerned. It is the 1st purpose that implementation of removal of impurities, such as coloring matter, tends to be continuously enabled without an expensive facility from the rough collagen solution after an extract process by purification filtration processing [ in / by this / the purification process above-mentioned in claim 1 ], and it is going to realize extensive purification of the collagen according to a need production scale. And compare with the above-mentioned conventional manufacture approach, and large compaction of a manufacture schedule is enabled. What enable it to adopt a production line [ exclusive ] unlike centrifugal separation, feel easy by this also from the health side anxious also about the contamination from the outside which is not, and he enables it to manufacture is the 2nd purpose. From the skin of the marine organism used as industrial waste in this way, it is going to enable offer of the collagen expected cheap offer in medical relation, makeup relation, and a food relation.

[0009] Next, it is setting the film size to less than 1.0 micrometers – 0.1 micrometers about the purification film for removing discard from the rough collagen solution from an extract process at the purification process in above-mentioned claim 1, if it is in claim 2. It is the 1st purpose that the more desirable purification effectiveness of not reducing recovery of a collagen furthermore and moreover not reducing particle removal effectiveness of coloring matter, either may be demonstrated. And further, in claim 2, it is an above-shown concentration process in this and claim 1, and it is the 2nd purpose that evasion with decline in impurity elimination factors, such as a pepsin, and the recovery fall of a collagen tends to be reconciled, and it is going to obtain the more desirable concentration effectiveness with using the film size as the marginal filtration film of less than 1000K–10K about the film for concentration which removes the impurity below the molecular weight fractionation of a purification collagen solution from the above-mentioned purification filtration process.

[0010] In order to be at above-mentioned claim 1 and claim 2 in the case of claim 3 and to raise the dependability about the more desirable purification effectiveness and the concentration effectiveness, it specifies the more desirable thing that the film size of the purification film specifies the film size of 0.2 micrometers – 0.6 micrometers and the film for concentration with 10K–100K.

[0011] And if it is in claim 4, it is in above-mentioned claim 1 thru/or above-mentioned claim 3. As opposed to the purification film same as the above and the film for concentration, respectively a rough collagen solution, a purification collagen solution, and a concentration collagen solution Make it make it penetrate so that it may intersect perpendicularly with the flow direction, and eliminate that an impurity accumulates on a film front face, and it is made for blinding not to produce it, and is going to raise more the purity of the enzyme meltable collagen finally obtained.

[0012] Next, it receives that you are going to make it increase the amount of the collagen from which the above-mentioned thing is in an extract process, advances extract and ATERO-ization to coincidence, and is extracted if it is after claim 5. Purification filtration is performed by removing an impurity from the rough collagen solution obtained by extract, and passing the purification film. It is going to make the impurity in a subsequent purification process easier to adopt purification filtration processing here and to remove, without being different in that this removes an impurity and it was made to perform ATERO-ization behind, and being based on centrifugal separation like the conventional example of said drawing 8 in this way.

[0013] Claim 5 is received like [ in claim 6 ] claim 2 to aforementioned claim 1. At an extract process and a purification process And the less than [ film size 1.0micrometer ] –0.1micrometer purification film, And at a concentration process, film size adopts the film for concentration of less than 1000K10K. By promoting the purification effectiveness and the concentration effectiveness, respectively and limiting the selection range like [ in claim 7 ] aforementioned claim 3 like 0.2 micrometers – 0.6 micrometers per each film size, and 10K–100K It is going

to obtain the more desirable result of the above-mentioned purification effectiveness and the concentration effectiveness. Moreover, when based on claim 8, to claim 5 thru/or claim 7, it is making it penetrate so that the purification film of an extract process or a purification process, the film [ in / further / a concentration process ] for concentration, and a rough collagen solution, the 1st and 2nd purification collagen solution, and a concentration collagen solution may cross at right angles to the flow direction, and is going to improve the impurity removal effectiveness.

[0014]

[Means for Solving the Problem] If this invention is in claim 1 in order to attain the above-mentioned purpose While adding an organic acid to the head end process which washes after degreasing the skin of a marine organism, and obtains a processed sample, and this processed sample and extracting a collagen The extract process which extracts a rough collagen solution by adding a proteolytic enzyme and performing ATERO-ization, The purification process which insoluble matter is removed [ process ] from the rough collagen solution concerned, and passes the purification film, It condenses by making the film for concentration pass the purification collagen solution obtained by this. By preceding any of sterilization filtration processing which pass the filtration sterilization film by the concentration process which removed the impurity below molecular weight fractionation, and pressurizing the concentration collagen solution obtained by this by dialysis processing and sterilization gas they are It is going to offer the manufacture approach of the marine organism origin collagen characterized by consisting of a sterilization filtration process of collecting the samples after sterilization filtration.

[0015] Furthermore, by claim 2, while adding to the contents of above-mentioned claim 1, adding an organic acid to the processed sample obtained in the head end process and extracting a collagen The extract process which extracts a rough collagen solution by adding a proteolytic enzyme and performing ATERO-ization, The purification process which insoluble matter is removed [ process ] from the rough collagen solution concerned, and passes the purification film by the membrane filter whose film size is less than 1.0 micrometers - 0.1 micrometers, It condenses by making the film for concentration whose film size is the ultrafiltration membrane of less than 1000K-10K pass the purification collagen solution obtained by this. By preceding any of sterilization filtration processing which pass the filtration sterilization film by the concentration process which removed the impurity below molecular weight fractionation, and pressurizing the concentration collagen solution obtained by this by dialysis processing and sterilization gas they are It is making into the contents to consist of a sterilization filtration process of collecting the samples after sterilization filtration.

[0016] Subsequently, in claim 3, it is in above-mentioned claim 1 or claim 2, and the purification film in a purification process and the film for concentration in a concentration process make it the contents to be 0.2 micrometers - 0.65 micrometers and the film size which are 10K-100K, respectively.

[0017] And if it is in claim 4, in claim 1 thru/or claim 3, the rough collagen solution, the purification collagen solution, and the concentration collagen solution make it the contents to penetrate towards intersecting perpendicularly to the flow direction, and to have made it go at the purification film in a purification process, and the film for concentration in a concentration process, respectively.

[0018] Subsequently, when based on claim 5, only the extract process is different from aforementioned claim 1 thru/or claim 4, purification filtration is carried out by adding an organic acid to the processed sample obtained by the head end process, removing insoluble matter from the rough collagen solution which extracted and obtained the collagen, and passing the purification film, subsequently a proteolytic enzyme is added, and it is made to perform ATERO-ization.

[0019] Moreover, in claim 6, while being in an extract process, passing the purification film by the membrane filter whose film size is less than 1.0 micrometers - 0.1 micrometers to the requirements for a configuration of claim 5 and carrying out purification filtration, the contents it was made to make condense by passing the film for concentration whose film size is the ultrafiltration membrane of less than 1000K-10K are added.

[0020] And in claim 7, the range of both the film size in above-mentioned claim 6 is \*\*\*\*(ed) further, and is carried out per [ of 0.2 micrometers - 0.65 micrometers of each ] filtration sterilization film, and to the purification film, and 10K-100K.

[0021] If it is in claim 8, in aforementioned claim 5 - claim 7, the purification film in an extract process Penetrate and go towards the rough collagen solution being parallel to the flow direction, and on the purification film in a purification process, and the film for concentration in a concentration process The rough collagen solution, the 1st and 2nd purification collagen solution, and the concentration collagen solution make it the contents to penetrate towards intersecting perpendicularly to the flow direction, and to have made it go, respectively.

[0022]

[Embodiment of the Invention] If the manufacture approach of the collagen concerning claim 1 thru/or claim 4 of this invention is explained below with reference to drawing 1 , drawing 2 and drawing 4 , and drawing 5 , it consists of the 1st head end process, the 2nd extract process, the 3rd purification process, the 4th concentration process, and the 5th sterilization filtration process in claim 1. Remove the unnecessary sections, such as the body, like the preceding opinion in inside, and beating is carried out to 3cm angle extent. the 1st head end process — the old contents of operation — the same — fishskins, such as salmon skin, — a stream — For example, a minced meat finishing fishskin is supplied and stirred to the mixed solution of chloroform and a methanol. After exchanging the solvent concerned and repeating re-stirring, it permutes by the methanol at a permutation and deionized water. After washing, The processed sample shown in drawing 1 by repeating washing by the buffer solution which contained NaCl 20 more%, and washing by deionized water by exchange of a penetrant remover, and removing

neutral protein is obtained.

[0023] The contents perform ATERO-ization like known also about the 2nd extract process by adding and stirring the proteolytic enzyme of 0, 5M acetic acid and 1% of pepsin of the weight for a substrate, or others on the extract tanks 1a and 1b in the manufacturing installation of drawing 2 which supplied the sample. Thus, if a rough collagen solution is obtained as ATERO-ization is performed to the extract and coincidence of a collagen by the above-mentioned organic acid, although there is an advantage which the amount of the collagen extracted increases, it is known that impurities, such as coloring matter, will also be mixed in coincidence into a solution in large quantities.

[0024] Thus, after the obtained rough collagen S1 removes insoluble matter using a nylon mesh etc., by working pump 2a of drawing 2, and 2b, it will move to the sample tank 3 and will carry out the 3rd new purification process here. That is, while the rough collagen S1 of the sample tank 3 makes the rate of flow control using Pumps 3a and 3b, after passing the purification film 4, the purification collagen solution S2 obtained here is transported to purification / concentration tank 5. And in order that the residue which had passage prevented may attain weighting of return and the amount of recovery of a collagen to the aforementioned sump tank 3 through the sample circulating flow way 6 in the example of illustration with the purification film 4, It is going to collect from the tank 7 for solvent addition further the collagen molecules contained in the residue concerned etc. by carrying out \*\*\*\* addition of the solvent by the above mentioned acetic acid etc. to the sample tank 3 with a pump 9 through the solvent addition passage 8.

[0025] If it is in the 4th concentration process carried out, next, the purification collagen solution S2 included in the above-mentioned purification / concentration tank 5 of drawing 2 After passing the film 11 for concentration, controlling the rate of flow etc. by the pump 10, It will be condensed by returning to purification / concentration tank 5 same as the above through the sample circulating flow way 12, and the insoluble matter produced at this time is discharged from the wastewater passage 13 with a solvent to the waste fluid tank 14. In this way according to the concentration process concerned The concentration collagen solution S3 is obtained by concentration of the purification collagen solution S2 whose volume increased, and removal of the impurity below molecular weight fractionation being made.

[0026] The 5th sterilization filtration process furthermore carried out is the same contents as substantially as said conventional it as it is shown in drawing 1. The \*\* style of the concentration collagen solution S3 obtained by the above mentioned purification / concentration tank 5 is carried out from the concentration sample passage 16 to the tank 17 for filtration sterilization with a pump 15. If liquid sending of the whole quantity finishes, by the pressurization gas 19 by the sterilization air from the gas passage 18 for pressurization, or sterilization nitrogen gas This is passed using the thing of 0.22 micrometers, the film size as filtration sterilization film 20 sends this to a freeze dryer 21, and considers [ sample S4 after filtration sterilization as a product is collected by this, or ] as a product, and an enzyme meltable collagen is obtained in this way. Of course, like known, it is good to perform temperature control covering all processes and to hold 10 degrees C or less at 4 degrees C - about 5 degrees C preferably, and this is for preventing proteinic denaturation in the meantime.

[0027] In addition, if it is incidentally in said purification process here, and the check of washing of the purification film 4, Flushing, and the initial Shimizu transparency rate of flow is performed beforehand and there is need behind above-mentioned Flushing, it is good to optimize the inside of a system by a buffer etc. Moreover, it is desirable to add water to a solvent etc. to an undiluted solution suitably, a pressure and temperature are set up with time, if the permeate liquid of an amount is obtained enough, pump 3b will be stopped, and the founding liquid in a transparency side system is collected as much as possible. Moreover, it is good this and to optimize the inside of a system about the aforementioned film 11 for concentration also as a concentration procedure incidentally by a check, a required buffer, etc. of the before said washing, Flushing, and the initial Shimizu transparency rate of flow, and it good to perform concentration by the concentration rate as occasion demands.

[0028] next — a claim — two — \*\*\*\*\* — the following — giving a full account — if — here — \*\*\*\* — a claim — one — explanation — an extract — a process — after — carrying out — having — purification — a process — it is — using — having — microfiltration — (— MF —) — the film — \*\*\*\*\* — purification — the film — four — this — continuing — operation — concentration — a process — using — having — concentration — \*\* — the film — 11 — \*\*\*\*\* — the — each — the film — size — specification — within the limits — selecting — making — \*\*\*\*. About the film size of the purification film 4, it is desirable first to be referred to as less than 1.0 micrometers - 0.1 micrometers. That is, when particle removal of coloring matter will become difficult when it is made the film size of 1.0 micrometers or more, and film size became smaller than 0.1 micrometers on the other hand, it was able to check that the recovery of a collagen fell. And about the film 11 for concentration, it is desirable that molecular weight fractionation uses less than [ - ] 1000K and 10 ultrafiltration (UF) film which is K. That is, recovery of a collagen will fall to the case of 1000K or more, and if it becomes small rather than 10K on the other hand, impurity elimination factors, such as a pepsin, will fall.

[0029] When furthermore based on claim 3, it sets to above-mentioned claim 1 or above-mentioned claim 2. If you are trying to select the still more desirable dimension range and it is made 0.2 micrometers - 0.65 micrometers about the purification film about the film size of the purification film 4 and the film 11 for concentration It was able to guarantee not reducing the particle elimination factor of coloring matter and not reducing recovery of a collagen by moreover being referred to as 0.2 micrometers or more, either by being referred to as 0.65 micrometers or less. Moreover, if it was in the film 11 for concentration, it was able to guarantee not reducing impurity elimination factors, such as a pepsin, and not reducing recovery of a collagen by considering as the film size of 10K-100K., either.

[0030] Now, if it is in claim 4, tangential flow fill tray SHON (TFF) is used about its all per film 11 for concentration of the purification film 4 of a purification filtration process used in above-mentioned claim 1 thru/or above-mentioned claim 3, and a concentration process. Usually, although it will penetrate towards making it the film F1 and the flow direction D1 of the transparency solution to this be in a rectangular condition, therefore being parallel to the flow direction D1 concerned like drawing 4 and will flow into the transparency side P1 in a busy membrane type. In above TFF, like drawing 5, the transparency solution of the rough collagen solution S1 or the purification collagen solution S2 will penetrate the film F2 of the pair which are the purification film 4 and the film 11 for concentration in the direction which intersects perpendicularly to the flow direction D2, respectively, and will flow into it to each transparency sides P2 and P3. Therefore, by using TFF, deposition of the impurity to the film surface of the film F2 etc. is prevented by flow of a transparency solution, and a transparency condition without clogging can be held. When based on claim 4 as a result, while being able to process that purification filtration processing and concentration processing within a short-term day extremely, it becomes possible to raise the recovery of a collagen, and impurity elimination factors, such as a particle of coloring matter, and a pepsin.

[0031] Next, if a full account is given per claim 5 or subsequent ones, by claim 5, it has the following differences to claim 1 of the preceding opinion first. That is, extract processing and ATERO-ized processing are not performed to coincidence like the above about that extract process as shown in drawing 1, but each \*\* carries out, and it can carry out by the \*\*\*\* manufacturing installation shown in drawing 3 in this case. said sample tank 3 and purification / concentration tank 5 which were carried out are that the 1st purification sample passage 23 which \*\*\*\*(ed) the pump 22 is open for free passage, and the place where the manufacturing installation of drawing 3 is different from it of drawing 2 here has them — the \*\* same sign is attached about the same member as drawing 2. [ natural ]

[0032] Now, it faces carrying out claim 5 using a manufacturing installation same as the above, and in order to carry out the extract process which is different from claim 1, it is in extract tank 1a about the processed sample S1 obtained according to the head end process like the front, an organic acid is added, and the rough collagen solution S1 which extruded and obtained the collagen is fed into the sample tank 3 by pump 2a. And controlling the rate of flow etc. by pump 3a and pump 3b like this and drawing 2, the purification film 4 is passed and the 1st purification collagen S5 is made to flow into purification / concentration collagen 5. The residue returns to the sample tank 3 through the sample circulating flow way 6 like this and a front. Moreover, in order to increase the amount of recovery, the solvent of a constant rate is added to the sample tank 3 from the solvent addition passage 8 from the tank 7 for solvent addition. Subsequently, if it is in claim 5 concerned, the 1st purification collagen solution S5 of said purification / concentration tank 5 is returned to the sample tank 3 with a pump 22 through the 1st purification sample passage 23 of the preceding opinion, and ATERO-ized processing is performed by adding a pepsin etc. here. Although the purification process of the next step performs purification filtration processing for what was ATERO-ized in this way, in the embodiment concerned, a repeat will be again refined through the purification film 4 as aforementioned, and the 2nd purification collagen solution S6 obtained by this will flow into the aforementioned purification / concentration tank 5. And the samples S7 after the 2nd filtration sterilization are henceforth collected like aforementioned claim 1 through a concentration process and a sterilization filtration process.

[0033] Next, at claim 6, it is going to reconcile securing the amount of recovery of a collagen, and removal of impurities, such as coloring matter, like claim 2 to said claim 1 by specifying the film size of the film [ in / for the film size of the purification film in the extract process in claim 5 / less than 1.0 micrometers ~ 0.1 micrometers and the purification film of a purification process and a concentration process ] for concentration as less than 1000K-10K.

[0034] Furthermore, he \*\*\*\* the specific value of the above-mentioned film size like claim 3 to claim 1, and is trying to obtain a more desirable result at claim 7 by carrying out to 0.2 micrometers - 0.65 micrometers, and 10K-100K, respectively.

[0035] And although the usual filtration film is used by the purification film of an extract process like claim 4 to claim 1 if it is in claim 8, it is using tangential flow fill tray SHON (TFF) which carried out the preceding opinion, and it tends to be engaged in a removal operation of an impurity and you are going to make it maintain the dependability about the purification film of a purification process, and the film for concentration of a concentration process.

[0036]

[Effect of the Invention] Since this invention can be carried out as mentioned above, when being based on claim 1 Although it is in the purification process after an extract process in the conventional process and impurities, such as a chromocyte, are removed, in centrifugal separation or a salting-out In view of making it mass-production impossible and attaching very at an expensive price, since the purpose cannot be attained and he was trying to depend on ultra-centrifugal separation further, abandon this purification process and at the purification process by purification filtration processing subsequently Since it was made to carry out a concentration process, extensive purification of the collagen according to a production scale can be realized without an expensive facility of impurity removal of coloring matter etc., and it becomes possible to satisfy the social request to a collagen. When furthermore based on claim 1, comparing with said conventional manufacture approach and shortening the manufacture days sharply was checked. Namely, if the concrete example of a comparison is shown, repeat operation of the centrifugal separation and the salting-out in a purification process in front of the former will be carried out 2 to 3 times. It enables what this had taken ten - 20 days to complete the new purification filtration process concerning this invention, and the concentration process carried out following on this in one - two days. And since both the processes concerned can adopt a production line [ exclusive ] unlike said conventional centrifugal



separation and ultra-centrifugal separation, there are no worries about external contamination and it becomes possible also from a sanitary field to manufacture in comfort.

[0037] If it is in claim 2, coexistence of the recovery of a collagen and the removal effectiveness of coloring matter and desirable coexistence with the recovery of a collagen and impurity elimination factors, such as a pepsin, can be enabled, respectively by specifying each \*\*\*\* size of each purification film and the film for concentration in both the above-mentioned processes, respectively. It is limiting the range of the film size in above-mentioned claim 2, if it is furthermore in claim 3, and it becomes possible to promote the effectiveness by claim 2 further, and the usual filtration film is not used about the purification film and the film for concentration in claim 4, but it becomes possible to raise more the purity of the final product applied to a collagen by adopting said TFF.

[0038] Next, if it is in claim 5, it is the extract process currently carried out also by the conventional process. Since the 1st purification collagen solution was obtained by abandoning the centrifugal separation processing concerned and performing purification filtration processing to being made to perform centrifugal separation processing between each processing with an extract and ATERO-izing Since it is in the purification filtration processing concerned before the purification process which is the continuation process, and a concentration process and removal of the impurity to a collagen is performed, it is benefiting—that it is easier to perform purification-manufacture of collagen with high purity size. And since the respectively same contingent effect as claims 2, 3, and 4 over above-mentioned claim 1 can be demonstrated about claims 6, 7, and 8, the applicable contents of the preceding opinion are used about the detail.

---

[Translation done.]

\* NOTICES \*

JP0 and NCIP1 are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

DESCRIPTION OF DRAWINGS

---

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is the process explanatory view showing the manufacture approach of the marine organism origin collagen concerning claim 1 concerning this invention, and claim 5.

[Drawing 2] It is the equipment schematic diagram having shown an example of the manufacturing installation which can enforce the manufacture approach concerning claim 1.

[Drawing 3] It is the equipment schematic diagram having shown an example of the manufacturing installation which can be used for enforcing the manufacture approach concerning claim 5.

[Drawing 4] It is the operation explanatory view showing the general-purpose purification film used for impurity removal.

[Drawing 5] It is the operation explanatory view having shown tangential flow fill tray SHON (TFF) used for impurity removal.

[Drawing 6] It is the vertical section explanatory view showing the mammalian stratum cutaneum membranae tympani.

[Drawing 7] It is the vertical section explanatory view showing the stratum cutaneum membranae tympani of a marine organism.

[Drawing 8] It is the process explanatory view having shown the approach of the conventional marine organism origin collagen manufacture.

[Description of Notations]

4 Purification Film

11 Film for Concentration

20 Filtration Sterilization Film

S1 Rough collagen solution

S2 Purification collagen solution

S3 Concentration collagen solution

S4 After [ sterilization filtration ] sample

S5 The 1st purification collagen solution

S6 The 2nd purification collagen solution

S7 After [ sterilization filtration ] sample

---

[Translation done.]